

**Recombinant of viral vector and human tumor suppressor gene, and use thereof**

**Patent number:** CN1401778  
**Publication date:** 2003-03-12  
**Inventor:** PENG ZHAOHUI (CN); ZHANG XIAOZHI (CN)  
**Applicant:** PENG ZHAOHUI (CN)  
**Classification:**  
- international: C12N15/86; C12N15/31; A61K48/00; A61P35/00  
- european:  
**Application number:** CN20020115228 20020508  
**Priority number(s):** CN20020115228 20020508

**Report a data error here**

**Abstract of CN1401778**

A recombinant adenovirus p53 is constructed from adenovirus vector and human p53 gene expression cassette by the homologous recombination of adenovirus vector with human p53 gene in E coli cell. Said human p53 gene expression cassette is a characteristic sequence of promoter-p53cDNA-polyadenine nucleotide. Said recombinant adenovirus p53 can be used to prepare clinic gene medicine for preventing and treating cancers.

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/86

C12N 15/31 A61K 48/00

A61P 35/00



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02115228.4

[43] 公开日 2003 年 3 月 12 日

[11] 公开号 CN 1401778A

[22] 申请日 2002.5.8 [21] 申请号 02115228.4

[71] 申请人 彭朝晖

地址 518057 广东省深圳市高新技术产业园  
(北区) 郎山路赛百诺公司

共同申请人 张晓志

[72] 发明人 彭朝晖 张晓志

[74] 专利代理机构 深圳市中知专利代理有限责任  
公司

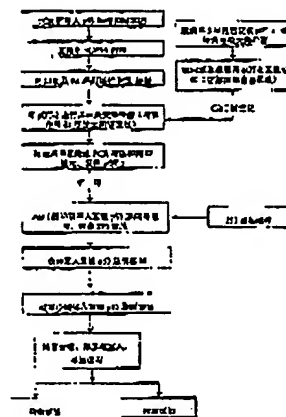
代理人 成义生

权利要求书 4 页 说明书 12 页 附图 14 页

[54] 发明名称 病毒载体与人肿瘤抑制基因的重组  
体及其应用

## [57] 摘要

一种病毒载体与人肿瘤抑制基因的重组体及其应用, 该重组体是将由 DNA 克隆技术构建的病毒载体与人肿瘤抑制基因表达盒相结合, 构建成一个能在基因工程改造过的特定细胞中扩增、繁殖, 也能在其核细胞中表达肿瘤抑制蛋白的融合序列。本发明将腺病毒载体与人 p53 基因在原核细胞 (E. coli) 中同源重组, 获得腺病毒载体与人 p53 基因表达盒构建的重组 p53 腺病毒。其人 p53 基因表达盒是由启动子 - p53cDNA - 多聚腺嘌呤核苷酸构成的特征序列。使用本发明的重组 p53 腺病毒, 可制备成临床级基因治疗制品, 用于治疗 and 预防人类各种恶性肿瘤。



知识产权出版社出版

02115228.4

## 权 利 要 求 书

第1/4页

1、一种病毒载体与人肿瘤抑制基因的重组体，其特征在于，该重组体是由 DNA 克隆技术构建的病毒载体与人肿瘤抑制基因表达盒相结合，构建成一个能在基因工程改造过的特定细胞中扩增、繁殖，也能在真核细胞中表达肿瘤抑制蛋白的融合序列。

2、如权利要求 1 所述的重组体，其特征在于，该重组体的载体可以为 DNA 病毒或 RNA 病毒的任一种。

3、如权利要求 2 所述的重组体，其特征在于，该重组体的载体是腺病毒载体或含有腺病毒载体序列的复合载体。

4、如权利要求 1 所述的重组体，其特征在于，所述人肿瘤抑制基因可以是具有对肿瘤抑制作用的基因中的任一种。

5、如权利要求 4 所述的重组体，其特征在于，所述人肿瘤抑制基因为 p53 基因。

6、如权利要求 1 所述的重组体，其特征在于，它是由腺病毒载体与 p53 基因构建而成，其融合序列为：

腺病毒 5 基因组序列右侧-ATGTTTACCGCCACACTCGCAGGGTCTGCACCTGGTGGGG  
TCTCATCGTACCTCAGCACCTTCCAGATC<sub>70</sub>TCTGACATGCGATGTCGACTCGACTGCTTCCGGAT  
GTACGGGCCAGATATACCGGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGCCAAAAGCGGGGCTTCG  
GTTGTACGGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGAAAT  
GTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTAC  
AAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTA  
GGAAGGCAACAGACGGCTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGCAGAGATATT  
GTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTACCCACATTGGTGTGCACCT  
CCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCCG<sub>120</sub>CTAGAGCCACCGTCCAGGGAGCAGGTAGCTGCTGGG  
CTCCGGGACACTTTGCGTTCCGGCTGGGAGCGTCTTTCCACGACGGTGACACGCTTCCCTGGAT  
TGGCAGCCAGACTGCTTTCCGGGTCACTGCC<sub>150</sub>ATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCCAG  
✓CCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTTCCTGAAAACAACGTTCTGTC

02115228.4

权 利 要 求 书 第2/4页

CCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCA  
CTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCCCCTGCA  
CCAGCAGCTCCTACACCGCGGGCCCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCCTGTCTCTTCTGTCCC  
TTCCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGCGCTTCTTGCATTCTGGGACAGCCA  
AGTCTGTGACTTGCAGTACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGC  
CCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCCGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTA  
CAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATA  
GCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTG  
GATGACAGAAACACTTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGGCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGCTCTGA  
CTGTACCACCATCCACTACAACCTACATGTGTAACAGTTCCCTGCATGGCGGCATGAACCGAGGC  
CCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAG  
GTGCGTGTTTGTGCCTGTCTGCGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGG  
GGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCCAACAACACCAGCTCCT  
CTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACCCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAG  
CGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGAAGTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGA  
GCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCC  
ATAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTGA<sub>1337</sub>CATTCTCCACTTCTTGTTT  
CCCCTGACAGCCTCCACCCCCATCTCTCCCTCCCCTGCCATTTTGGGTTTTGGGTCTTTGAAC  
CCTTGCTTGCAATAGGTGTGCGTCAGAAGCACCCAGGACTTCCATTTGCTTTGTCCCGGGGCTCC  
ACTGAACAAGTTGGCCTGCACTGGTGTTTTGTGTGGGAGGAGGATGGGGAGTAGGACATACCA  
GCTTAGATTTTAAGGTTTTTACTGTGAGGGATGTTTGGGAGATGTAAGAAATGTTCTTGCACTTA  
ACGGTTAGTTTACAATCAGCCACATTCTAGGTAGGGGCCACTTCACCGTACTAAGCAGGGAAGCT  
GTCCCTCACTGTTGAATTTTCTCTAACTTCAAGGCCCATATCTGTGAAATGCTGGATTTGCCCTA  
CCTCGGAATGCTGGCATTGTCACCTACCTCACAGAGTGCATTGTGAGGGTT<sub>2197</sub>AATGAAATAATG  
TACATCTGGCCTTGAAACCACCTTTTATTACATGGGGTCTAGCGGGATCCACTAGTAACGCGGCC  
AGTGTGCTGGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGCTCG  
CTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCCT  
CCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCAT

02115228.4

权 利 要 求 书 第3/4页

TGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGCGGTGGGCTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG  
 GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCA  
 GCTGGGGCTCGAGGGGGATCCCCACGCTAGAGCT<sub>2773</sub>GACTATAATAATAAAACGCCAACTTTGAC  
 CCGGAACGCGGAAAACACCTGAGAAAAACACCTGGGCGAGTCTCCACGTAAACGGTCAAAGTCCC  
 CGCGGCCCTAGACAAATATTA<sub>2848</sub>-腺病毒 5 基因组序列左侧

其中:

- 1) 腺病毒 5 基因组序列右侧和腺病毒 5 基因组序列左侧见腺病毒 5 基因组全序列 (Genbank No: NC-001406)
- 2) 1-70: 腺病毒右侧臂 (70 位碱基位于腺病毒 5 基因组序列正向 3328 位)
- 3) 71-523: Rous 肉瘤病毒的 LTR (启动子)
- 4) 524-655: 5'端非翻译区
- √5) 656-1837: p53 基因的编码序列
- 6) 1838-2733: 3'端非翻译区 (其中从 2298 开始为多聚腺苷酸尾 poly A)
- 7) 2734-2848: 腺病毒左侧臂 (2734 位碱基位于腺病毒 5 基因组序列正向 452 位碱基)

7、如权利要求 1 所述的重组体, 其特征在于, 该重组体的基因表达盒是由启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸构成的特征序列。

8、如权利要求 7 所述的重组体, 其特征在于, 所述基因表达盒的上游为任一真核细胞启动子、原核细胞启动子或病毒启动子, 下游为任何真核基因的多聚腺嘌呤核苷酸。

9、如权利要求 1 所述的重组体, 其特征在于, 该重组体是在原核细胞中同源重组获得的, 首先是腺病毒与质粒 pGT-1 (含有腺病毒两侧反向重复序列) 在大肠杆菌中同源重组获得重组体 pGT-2, 再与人工构建的“腺病毒右侧臂/启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸/腺病毒左侧臂” 在大肠杆菌中同源重组获得重组体 pGT-3, 随后经内切酶 *PacI* 线性化去除原核质粒序列, 获得重组 p53 腺病毒体。

10、如权利要求 9 所述的重组体, 其特征在于, 该重组体在任何原核

02115228.4

权 利 要 求 书 第4/4页

细胞中以同源重组的方式获得。

11、如权利要求 1 所述的重组体用于制备治疗各种恶性肿瘤的药物。

12、如权利要求 1 所述的重组体用于制备预防肿瘤的发生和手术切除后的肿瘤再生的药物。

13、如权利要求 1 所述的重组体用于制备进行静脉注射、动脉注射、瘤内注射、肌肉注射、皮下注射、器官注射和胸、腹水内注射的药物。

## 病毒载体与人肿瘤抑制基因的重组体及其应用

### 技术领域

本发明涉及基因工程技术，更具体地说是涉及一种由人类肿瘤抑制基因 p53 与腺病毒载体重组序列构建成的重组体。

### 背景技术

随着分子生物学技术的进步，特别是基因工程技术的发展，恶性肿瘤的基因治疗成为人们研究的热点。目前，全球共有 600 多项基因治疗方案获准进入临床试验，有些治疗方案已获得了一定的疗效，初步显示了基因治疗的前景。

作为可用于基因治疗的各种载体，本身不具有任何治疗疾病的意义，无临床应用价值；而作为可用于各种治疗目的基因，由于导入靶细胞及在靶细胞内表达的难度，只具有潜在的治疗作用，而不具备实用的临床价值。只有将具有潜在治疗作用的基因与可转移基因的载体结合，通过后者介导，将目的基因导入靶细胞并表达，才能达到真正的临床治疗效果。因此，构建治疗基因与基因载体的融合序列是实现基因治疗的关键。

将目的基因的表达盒与载体进行融合常用的方法是在真核细胞中进行同源重组，过程复杂，费时费力。而使用在原核细胞（大肠杆菌）中实现同源重组，构建融合表达载体的新技术则可有效解决上述问题。

缺乏特异性、靶向性及高效性的基因转移载体一直是肿瘤基因治疗的一个难题。目前，用于基因治疗研究的载体主要分为病毒载体和非病毒载体两大类。常用的病毒载体有腺病毒载体、腺相关病毒载体和逆转录病毒载体等。腺病毒载体是常用的基因载体，它的优点在于转染效率高、可操作性好、能携带较大的目的基因片断、可制备高效价的病毒颗粒，易于工业化生产，既能感染分裂期细胞也可感染非分裂期细胞，具有安全、致病性

02115228.4

低等优点。但也存在不足之处，一是感染缺乏特异性，二是具有免疫原性。因此，对腺病毒载体进行存利去弊的改进是发展基因治疗的必由之路。研究表明，腺病毒载体 E1 或 E3 缺失区携带外源性基因时，可以实现目的基因的较长时间的表达，且可降低其免疫原性；逆转录病毒载体能携带外源性基因整合进靶细胞基因组中实现目的基因稳定持久的表达，但逆转录病毒体外繁殖滴度低、转染效率低，只感染分裂期细胞，对染色体的随机整合，有致癌的危险性；其他可用于基因转移的病毒载体和非病毒载体均存在不同的利弊。

### 发明内容

本发明旨在将具有潜在治疗作用的基因与可转移基因的载体进行有机结合，而提供一种病毒载体与人肿瘤抑制基因的重组体，使得人类肿瘤抑制基因与病毒载体构成融合序列，使之在基因工程改造过的特定细胞中繁殖、生产，并可直接在真核细胞中表达，达到预防或/和治疗肿瘤的目的。

本发明的目的还在于提供该重组体的制备方法及其用于制备预防或/和治疗肿瘤药物的应用。

为实现上述目的，本发明提供一种病毒载体与人肿瘤抑制基因的重组体，该重组体是由 DNA 克隆技术构建的病毒载体与人肿瘤抑制基因表达盒相结合，构建成一个能在基因工程改造过的特定细胞中扩增、繁殖，也能在真核细胞中表达肿瘤抑制蛋白的融合序列。

该重组体的载体可以为 DNA 病毒或 RNA 病毒的任一种，其优选载体为腺病毒载体或含有腺病毒载体序列的复合载体，最优选载体为腺病毒载体。

所述人肿瘤抑制基因可以是具有对肿瘤抑制作用的基因中的任一种，其最优选基因为 p53 基因。

该重组体由腺病毒载体与 p53 基因构建而成，定义为重组 p53 腺病毒体，其融合序列为：

腺病毒 5 基因组序列右侧-ATGTTTACCGCCACACTCGCAGGGTCTGCACCTCGTGCGGG  
TCTCATCGTACCTCAGCACCTTCCAGATC,TCTGACATGCGATGTCGACTCGACTGCTTCGCGAT



02115228.4

说明书 第3/12页

GTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTAGGCGAAAAGCGGGGCTTCG  
GTTGTACGCGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGGAAT  
GTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATCAGTTAGCAACATGCCTTAC  
AAGGAGAGAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTA  
GGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCGGCATTGCAGAGATATT  
GTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTACCCACATTGGTGTGCACCT  
CCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCCG<sub>523</sub>CTAGAGCCACCCTCCAGGGAGCAGGTAGCTGCTGGG  
CTCCGGGGACACTTTGCGTTCCGGCTGGGAGCGTCTTTCACGACGGTGACACGCTTCCCTGGAT  
TGGCAGCCAGACTGCTTTCCCGGTCACTGCC<sub>833</sub>ATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAG  
CCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTTCCTGAAAACAACGTTCTGTCT  
CCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCA  
CTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCCCCTGCA  
CCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCCTGTCATCTTCTGTCCC  
TTCCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCAATTCTGGGACAGCCA  
AGTCTGTGACTTGCACGTA CTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGCCCAAGACCTGC  
CCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTA  
CAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATA  
GCGATGGTCTGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAAATTTGCGTGTGGAGTATTTG  
GATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTCCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGCTCTGA  
CTGTACCACCATCCACTACA ACTACATGTGTAACAGTTCTGCA TGGGCGGCATGAACCGGAGGC  
CCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAG  
GTGCGTGTGTTGTCCCTGTCTCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGG  
GGAGCCTGACCACGAGCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCCAACAACACCAGCTCCT  
CTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACCCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAG  
CGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGA ACTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGA  
GCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCCGC  
ATAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTGA<sub>1837</sub>CATTCTCCACTTCTGTTC  
CCCACTGACAGCCTCCACCCCCATCTCTCCCTCCCCTGCCATTTTGGGTTTGGGTCTTTGAAC

02115228.4

说明书 第4/12页

CCTTGCTTGCAATAGGTGTGCGTCAGAAGCACCCAGGACTTCCATTTGCTTTGTCCCGGGGCTCC  
 ACTGAACAAGTTGGCCTGCACTGGTGTGTTTTGTTGTGGGGAGGAGGATGGGGAGTAGGACATACCA  
 GCTTAGATTTTAAGGTTTTTACTGTGAGGGATGTTGGGAGATGTAAGAAATGTTCTTGCACTTA  
 AGGGTTAGTTTACAATCAGCCACATTCTAGGTAGGGGCCACTTCACCGTACTAACCAGGGAAGCT  
 GTCCCTCACTGTTGAATTTTCTCTAACTTCAAGGCCCATATCTGTGAAATGCTGGATTTGCCCTA  
 CCTCGGAATGCTGGCATTGTCACCTACCTCACAGAGTGCATTGTGAGGGTT<sub>2297</sub>AATGAAATAATG  
 TACATCTGGCCTTGAAACCACCTTTTATTACATGGGGTCTAGCGGGATCCACTAGTAACGCCGCC  
 AGTGTGCTGGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGCTCG  
 CTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCTT  
 CCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCAT  
 TGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTCGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG  
 GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCA  
 GCTGGGGCTCGAGGGGGATCCCCACGCTAGAGCT<sub>2733</sub>GACTATAATAATAAAACGCCAACTTTGAC  
 CCGGAACGCGGAAAACACCTGAGAAAAACACCTGGGCGAGTCTCCACGTAAACGGTCAAAGTCCC  
 CGCGGCCCTAGACAAATATTA<sub>2848</sub>-腺病毒 5 基因组序列左侧

其中:

1. 腺病毒 5 基因组序列右侧和腺病毒 5 基因组序列左侧见腺病毒 5 基因组全序列 (Genbank No: NC-001406)
2. 1-70: 腺病毒右侧臂 (70 位碱基位于腺病毒 5 基因组序列正向 3328 位)
3. 71-523: Rous 肉瘤病毒的 LTR (启动子)
4. 524-655: 5'端非翻译区
5. 656-1837: p53 基因的编码序列
6. 1838-2733: 3'端非翻译区 (其中从 2298 开始为多聚腺苷酸尾 poly A)
7. 2734-2848: 腺病毒左侧臂 (2734 位碱基位于腺病毒 5 基因组序列正向 452 位碱基)

该重组体的基因表达盒是由启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸构成的特征序列, 其上游为任一真核细胞启动子、原核细胞启动子或病毒启

动子，下游为任何真核基因的多聚腺嘌呤核苷酸。

本发明的重组体是通过如下方法获得的，重组病毒载体是在原核细胞中同源重组获得的，首先是腺病毒与质粒 pGT-1（含有腺病毒两侧反向重复序列）在大肠杆菌中同源重组获得重组体 pGT-2，再与人工构建的“腺病毒右侧臂/启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸/腺病毒左侧臂”在大肠杆菌中同源重组获得重组体 pGT-3，随后经内切酶 *PacI* 线性化去除原核质粒序列，获得重组 p53 腺病毒体。

实质上，该重组体可在任何原核细胞中以同源重组的方式获得。

根据上述方案，将 PCR 扩增腺病毒 5 两侧的 LTR 序列，分别引入 *PacI* 酶切位点。将两侧的 LTR 序列均克隆到 pUC18 载体中，构成重组载体 pGT-1；将构建的 pGT-1 载体与腺病毒 5 基因组共转染大肠杆菌株 BJ5183（赛百诺公司保存，保存号：P-e012），使腺病毒 5 基因组与 pGT-1 发生同源重组，阳性病毒克隆经扩增、PCR 筛选和酶切鉴定，获得含有腺病毒 5 全基因组的重组载体 pGT-2。

以 5' ATGGAGGAGCCGCGAGTCAGATC 和 3' ATATCTGCAGAATTCCAGCAC 作为引物，通过 PCR 扩增人类肿瘤抑制因子 p53 基因，将扩增的全长 p53 基因（含有 5' 和 3' 端非翻译区序列）克隆到原核质粒 pUC19，进行测序验证。随后，PCR 分别扩增 RSV（Rous sarcoma virus）的 LTR 序列（含启动子）、BGH 的 PA 序列和腺病毒 E1 区序列，并于一侧分别引入 linker 序列，测序验证。再次进行 PCR 反应时，将 LTR 和 PA 序列分别拼接 to 紧靠 p53 基因的 5' 和 3' 端。将腺病毒 E1 区及其上游序列分别拼接 to p53 基因的最外侧，构成 p53 复合基因（见图 1）。

将构建好的重组载体 pGT-2 和 p53 复合基因共转染大肠杆菌株 BJ5183，使二者发生同源重组。同上，阳性克隆经扩增、PCR 筛选和酶切鉴定，获得重组载体 pGT-3，该载体中含有腺病毒 5 大部分序列（其 E1 区及上游部分序列被 p53 基因表达盒置换）。重组载体 pGT-3 经 *PacI* 酶切线性化，去除来源于 pUC18 的载体序列，转染 293 细胞（赛百诺公司冻存，保存号：B-393）培养，在细胞内包装成含有腺病毒顺式活化序列（cis-acting sequence）

与 LTR 的启动子操纵的人肿瘤抑制基因 p53. 组建成转染效率高、可操作性强、由单启动子控制的重组 p53 腺病毒体。

该重组 p53 腺病毒体具有下列特点:

它是由腺病毒载体和 p53 基因人工表达盒两部分构成,

1、结构特点: 其本质是一个活的重组腺病毒体, 不同于现有的化学合成药物、中药、基因工程药物, 是直接实现目的基因的体内表达, 生物学活性高, 可有效达到治疗作用; 腺病毒载体能携带较大的基因、转染率高、可制备高效价的病毒颗粒, 宿主范围广, 安全性好, 致病性低, 尤其是经改建后的腺病毒载体免疫原性大大下降, 使目的基因易于在机体内稳定、持久表达; p53 基因人工表达盒是用腺病毒载体单启动子直接调控 p53 基因的表达, 且有完整的多聚腺苷酸加尾信号, 从而构成一个完整的表达盒 (expression cassette), 可调控 p53 基因在靶细胞中高效表达。

2、应用特点: 该重组 p53 腺病毒体为广谱抗癌药, 具有对各种恶性肿瘤的治疗作用。II 期临床实验显示, 该重组 p53 腺病毒体对头颈部鳞癌、肺癌等十多种肿瘤具有明显的治疗作用; 该重组 p53 腺病毒体具有预防肿瘤发生的独特作用。I 期临床试验及术后 3 年随访表明, 该重组 p53 腺病毒体可预防喉癌等肿瘤病人的术后复发, 起到肿瘤疫苗的作用。

利用本发明的重组 p53 腺病毒体可制备治疗各种恶性肿瘤的药物, 并可制备预防肿瘤的发生和手术切除后的肿瘤再生的药物。

本发明的重组 p53 腺病毒体还可用于制备进行静脉注射、动脉注射、瘤内注射、肌肉注射、皮下注射、器官注射和胸、腹水内注射的药物。

本发明利用所制备的重组 p53 腺病毒体, 先转染到基因工程改造过的特定细胞中培养、繁殖, 浓缩纯化成可用于临床的重组腺病毒 p53 抗癌注射液。

其中本发明实验所用的 293 细胞系 (ATCC CRL-1573, 第 32 代次, 1997 年 6 月 13 日从 ATCC 订购) 来源于经 5 型腺病毒 (Ad5) DNA 转化人胚胎肾上皮细胞获得, 含有 Ad5 5'端的 11%的基因组 (包括 E1a)。该细胞对腺病毒的感染和生长是高度许可的。

02115228.4

说明书 第7/12页

应用该重组 p53 腺病毒体对 12 例中、晚期喉癌病人进行Ⅰ期临床实验, 治疗后并随访 31-36 个月。结果显示, 该重组 p53 腺病毒体使用安全, 全部 12 例病人无肿瘤复发。目前, 临床上中晚期喉癌病人 3 年生存期只有 44%, 手术后 6-12 个月的复发率约 20%。本发明的实验结果显示, 该重组 p53 腺病毒体具有治疗和预防肿瘤复发的双重作用。从 2001 年开始进行Ⅱ期临床实验, 已显示良好的治疗作用。实施例附图 9 至 13 的结果显示, 一些对常规治疗方法(化疗和放疗)无效的病人, 使用本发明的重组 p53 腺病毒体仍具有良好的治疗作用。

本发明的贡献在于, 它利用人类肿瘤抑制基因 p53 能抑制多种肿瘤细胞生长的特点, 将其克隆到腺病毒 E1 株, 通过瘤体注射, 使腺病毒有效地将 p53 基因导入肿瘤组织, 表达出 P53 蛋白后, 抑制肿瘤组织的生长, 使肿瘤细胞出现生长阻滞或凋亡, 从而达到抑制肿瘤的目的。该发明同时也解决了由于 P53 蛋白半衰期短(约 20 分钟)、不稳定、无法体外制备成为重组基因工程产品的问题, 即实现了 p53 基因的肿瘤治疗。

该重组 p53 腺病毒体利用腺病毒携带人类肿瘤抑制基因 p53, 直接在肿瘤细胞中表达, 从而解决了由于 P53 蛋白不稳定、无法用基因工程的方法体外制备成重组基因工程产品的问题。用腺病毒以及腺相关病毒进行癌症治疗, 病人可在体内持续、高效表达 P53 蛋白, 并在蛋白质分子修饰程序上, 如蛋白质磷酸化、蛋白质折叠以及多聚化等方面都具有与体内真核生物相同的特性。本发明的重组 p53 腺病毒体可直接介导 p53 基因在真核细胞中表达, 也就是说可以直接导入实体瘤部位让其表达, 使受治疗者自身变成一个可生产人类肿瘤抑制因子 P53 蛋白的“源泉”。这种方法实现将外源 p53 基因的体内转移并在病人瘤体内高效表达而达到治疗目的, 使得肿瘤及其它疾病的基因治疗成为现实。

#### 附图说明

图 1 是本发明的重组 p53 腺病毒体的构建过程示意图。

图 2 是本发明的重组 p53 腺病毒体的技术路线框图。

02115228.4

说明书 第8/12页

图3是重组p53腺病毒体经多次传代后,以5'CCACGACGGTGACA CGCTTC和5' CAAGCAAGGGTTCAAAGAC为引物,以p53cDNA为模版,通过PCR扩增得到的p53基因的琼脂糖凝胶电泳图,以鉴定其稳定性。

图4是重组p53腺病毒体(赛百诺公司冻存,保存号: No-1,下同)感染293细胞后36小时,经细胞裂解、提取病毒DNA经PCR鉴定的琼脂糖凝胶分析结果。

图5是重组p53腺病毒体感染293细胞后36小时,经细胞裂解、提取后经Western blot分析结果。

图6是重组p53腺病毒体不同剂量对Hep-2细胞的杀伤效应的曲线示意图。

图7是重组p53腺病毒体对Hep-2细胞生长的抑制作用的曲线示意图。

图8是重组p53腺病毒体感染Hep-2细胞36小时后的光镜照片。

图9是重组p53腺病毒体对临床鼻咽癌病人治疗作用(II期临床)的CT照片。

图10是重组p53腺病毒体对临床肺癌病人治疗作用(II期临床)的CT照片。

图11是重组p53腺病毒体对临床甲状腺癌病人治疗作用(II期临床)的CT照片。

图12是重组p53腺病毒体对临床宫颈癌病人治疗作用(II期临床)的CT照片。

图13是重组p53腺病毒体对临床食道癌病人治疗作用(II期临床)的CT照片。

### 具体实施方式

下列实施例是对本发明的进一步解释和说明,对本发明不构成任何限制。

#### 实施例1

如图1和图2所示,构建重组p53腺病毒体及鉴定

02115228.4

说明书 第9/12页

1、已发表的 p53 基因 cDNA 全序列，设计合成两段引物：

5' ATGGAGGAGCCGCGAGTCAGATC 和 5' ATATCTGCAGAATTCCAGCAC 作为引物，两端分别引入 linker 序列。以 HeLa 细胞 cDNA 为模板，经 PCR 方法扩增得到人 p53 基因，其中，反应条件为：第一循环：94℃ 变性 4 分钟，58℃ 退火 1 分钟，72℃ 延伸 2 分钟；以后各循环：94℃ 变性 1 分钟，58℃ 退火 1 分钟，72℃ 延伸 2 分钟，共 30 个循环。由此得到大量的 p53 基因；用琼脂糖凝胶电泳分析，回收得到 p53 基因全长，片段纯化后再用此酶切割 p53 基因，插入到同样酶切的 pUC19 载体中测序，测得编码区的碱基序列和推导的氨基酸序列（与 GenBank Acc XM-058834 一致），随后酶切回收。

2、PCR 反应扩增 LTR 和 PA 序列，引物分别为：

5'TCTGACATGCCGATGTCCGACTCG，5' CCGCAGTGACCCGAAAGCAG；5' TCACAGAGTGCA TTGTGAGGG，5' GCTCTAGCGTGGGATCCC。分别于 5' 引物和 3' 端引物引入 linker 序列。同上的退火条件下，PCR 扩增 LTR 和 PA 序列，纯化后克隆测序验证。

3、PCR 反应分开扩增腺病毒的 E1 序列，反应条件同上，两端引物分别引入 Bam HI 和 Eco RI 酶切位点，扩增后测序验证。

4、将 1 所得序列分别与 2 所得的两条序列进行 PCR 反应，反应条件同前，得到 PCR 拼接产物 LTR-p53-PA。进一步测序验证。

5、将 3 所得序列与 4 所得序列 LTR-p53-PA 经 T4 DNA 粘接酶粘接，获得 p53 复合基因。

6、PCR 反应分别扩增腺病毒两端 IRT 序列，反应条件同上，测序验证后分别将两段序列克隆到 pUC18 载体中构成重组载体 pGT-1。

7、提取野生型腺病毒 5 (ATCC-VR-5, 腺病毒株 75, 滴度: 10 (6.75) TCID<sub>50</sub> /ml) DNA, 与重组载体 pGT-1 共转染大肠杆菌 BJ5183, 经 4℃ 孵育 30 分钟, 42℃ 热休克 50 秒钟, 再在 4℃ 孵育 1 分钟, 加 1ml LB 培养液 1 小时, 将温育的工程菌转入含安卡青霉素的琼脂培养板, 24 小时后, 用灭菌牙签挑取单个细菌克隆, 然后放入干净的含有 LB 的培养瓶中, 24 小时后, 按常规方法提取质粒, 用 *PacI* 切割筛选, 获得阳性克隆为 pGT-2 (含有 Ad5 全序列)。

02115228.4

8、将 p53 复合基因与重组载体 pGT-2 共转染大肠杆菌 BJ5183, 同上方方法培养, 筛选和鉴定, 获得阳性克隆 pGT-3, 含有腺病毒全基因组序列及插入的 p53 基因表达盒, 再用 *PacI* 酶切, 使之线性化, 去除来源于 pUC18 的载体序列。

9、将分离的阳性质粒线性化后经  $\text{CsCl}_2$  纯化, 经  $\text{CaCl}_2$  方法转染 293 细胞。7 天后, 收集细胞, 1000rpm 离心 15 分钟, 弃上清, 细胞经  $37^\circ\text{C}$ - $80^\circ\text{C}$  冻融, 裂解三次, 4000rpm 离心 30 分钟, 取上清, 弃沉淀, 上清经二次感染, 扩增病毒, 以同样方法裂解病毒, 上清经  $\text{CsCl}_2$  密度梯度离心, 条件为:  $4^\circ\text{C}$  60000 rpm, 16 小时。经 7 号注射针头取重组腺病毒体分离带。用 Spectra MW6000 透析袋在 NIH 缓冲液中透析 4 小时, 整个过程保持  $4^\circ\text{C}$ 。取出病毒液, 用  $0.25\mu\text{m}$  的滤膜过滤除菌, 分装, 于  $-80^\circ\text{C}$  保存, 一部分作空斑形成试验及病毒颗粒含量测定。

10、重组 p53 腺病毒体的结构稳定性鉴定, 经多次传代后, 提取其基因组 DNA, 以 p53 基因两端  $5'\text{CCACGACGGTGACACGCTTC}$  和  $5'\text{CAAGCAAGGCTTCAAAGAC}$  为引物, 进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 3; 以重组 p53 腺病毒体表达装置两侧的腺病毒臂  $5'\text{TTT CTC AGG TGT TTT CCG C}$  和  $5'\text{CAT CGT ACC TCA GCA CCT TC}$  为引物, PCR 鉴定结果见图 4。以上结果均表明重组 p53 腺病毒体经多次传代后结构稳定。

12、重组 p53 腺病毒体介导的 p53 基因在 Hep-2 和 H1299 细胞的表达鉴定。用重组 p53 腺病毒体感染 293 细胞 36 小时后, 常规方法裂解细胞, 以 P53 蛋白特异性抗体进行 western blot 分析, 结果见图 5。

13、重组 p53 腺病毒体对 Hep-2 细胞作用的时间与剂量关系。重组 p53 腺病毒体感染 Hep-2 细胞 36 小时后, 分别研究其不同剂量和不同作用时间对 Hep-2 细胞的杀伤作用、以台盼蓝染色记数死亡细胞数, 结果见图 6 和图 7。

## 实施例 2

重组 p53 腺病毒体对肿瘤细胞杀伤作用:

将重组 p53 基因腺病毒常规方法转染培养的 Hep-2 细胞。各组细胞数



02115228.4

说明书 第11/12页

相同,实验分以下各组: 1. 空白对照; 2. MOI 200; 3. MOI 150; 4. MOI 100; 5. MOI 50; 6. MOI 10. 7. GFP virus MOI 200; 8. GFP virus MOI 150. 转染后继续培养 36 小时, 光镜观察, 可见在 MOI>50 时, 均可见到重组 p53 腺病毒体对 Hep-2 细胞的杀伤作用, 且随着剂量的增加杀伤作用更加明显, 光镜观察细胞出现明显的固缩变小等凋亡表现, 如图 8 所示。

### 实施例 3

重组 p53 腺病毒体的临床治疗作用 (鼻咽癌):

如图 9 所示, 重组 p53 腺病毒体在国家药品监督管理局指定的医院进行 II 期临床实验 (下同), 图 9 显示为一位鼻咽癌患者在接受重组 p53 腺病毒体治疗前后的 CT 照片, 左图为治疗前的癌肿块, 右图为接受治疗后 (肿块缩小 87%, 伴瘤内出现坏死), 目前已有超过 60 例患者接受了 II 期临床实验, 疗效确凿。

### 实施例 4

重组 p53 腺病毒体的临床治疗作用 (肺癌):

如图 10 所示, II 期临床实验, 重组 p53 腺病毒体在 II 期临床实验中对肺癌的治疗作用。女性左肺腺癌患者、左胸腔积液, 伴肝转移、骨转移和脑转移。经多次抽液和化疗后, 胸腔中仍有大量积液出现。病人接受胸腔内注射重组 p53 腺病毒体一个月后, 胸腔内积液完全消失。

### 实施例 5

重组 p53 腺病毒体的临床治疗作用 (甲状腺癌):

如图 11 所示, II 期临床实验, 重组 p53 腺病毒体在 II 期临床实验中对甲状腺癌的治疗作用。女性甲状腺癌患者, 术后 1 年局部复发, 右上颈淋巴转移, 病理诊断为低分化鳞癌, 经放疗-化疗-热疗联合治疗 1 个年后无效, 颈前肿瘤压迫气管, 呼吸困难。随后接受重组 p53 腺病毒体的治疗, 共注射 8 次, 肿块明显缩小 (缩小 48%)。

### 实施例 6

重组 p53 腺病毒体的临床治疗作用 (宫颈癌):

如图 12 所示, II 期临床实验, 重组 p53 腺病毒体在 II 期临床实验中

02115228.4

对宫颈癌的治疗作用。宫颈癌患者，病理诊断为鳞癌。接受重组 p53 腺病毒体的治疗(共注射 8 次)后，肿块明显缩小(约 91%)，三个月后复查，肿块完全消失。

#### 实施例 7

重组 p53 腺病毒体的临床治疗作用(食道癌转移):

如图 13 所示，II 期临床实验。重组 p53 腺病毒体在 II 期临床实验中  
对食道癌淋巴结转移的治疗作用。食道癌左锁骨上淋巴结转移患者，病理  
诊断为鳞癌。经放疗后无效，接受重组 p53 腺病毒体的治疗后，共注射 8  
次，肿块明显缩小(缩小 29%)。

02115228.4

## 说明书附图

第1/14页

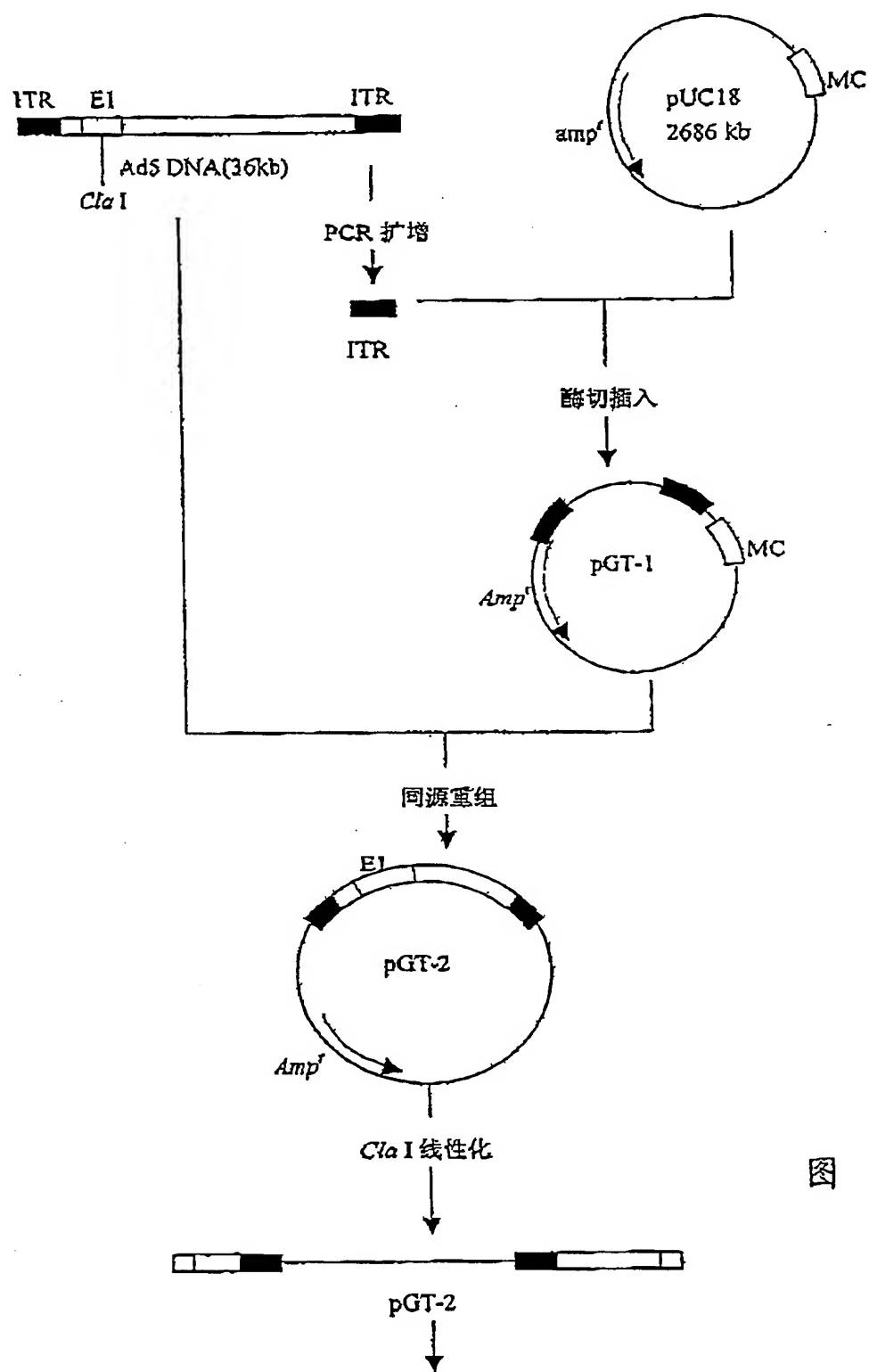


图 1A

02115228.4

说明书附图 第2/14页

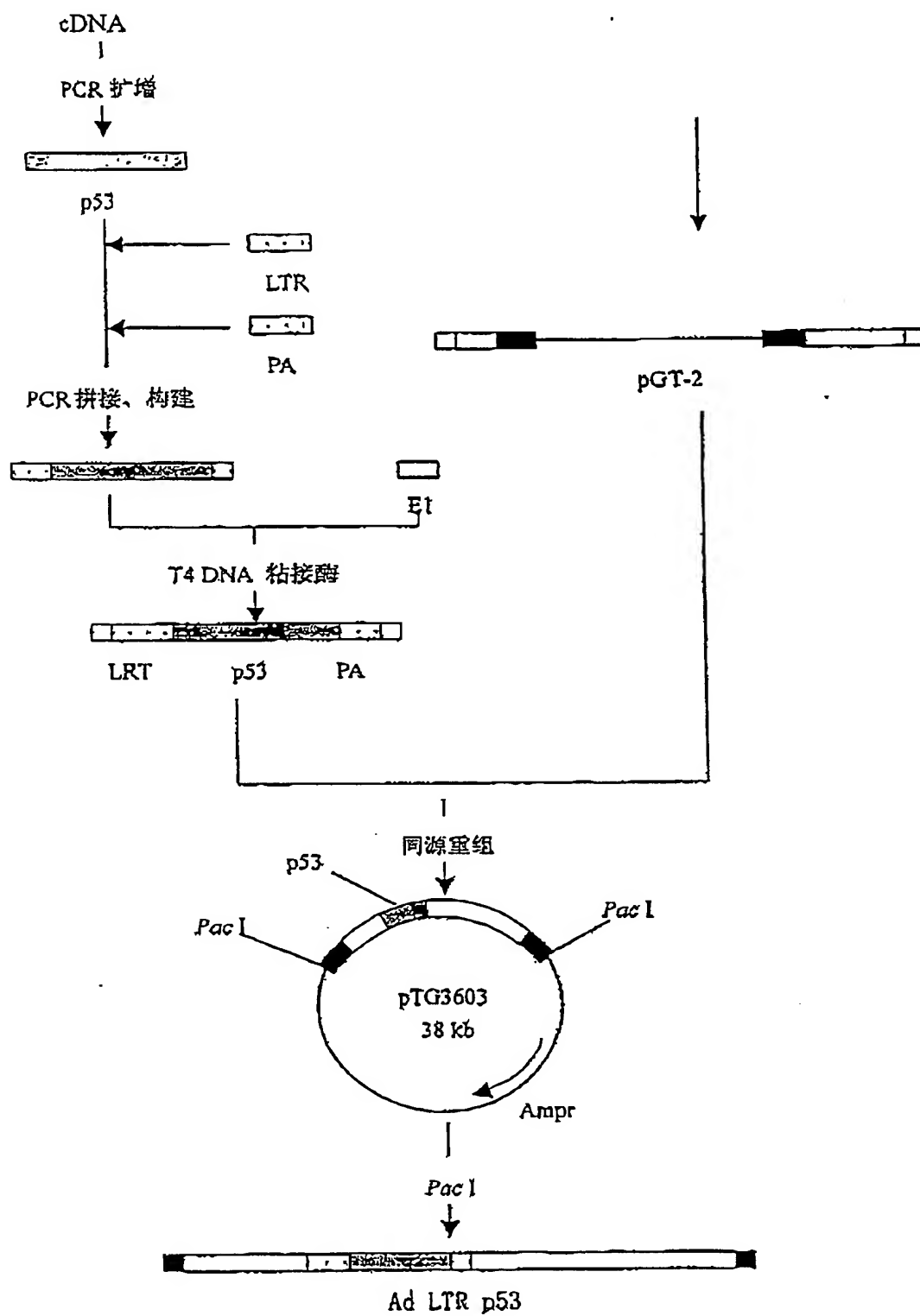


图 1B

02115228.4

说明书附图 第3/14页

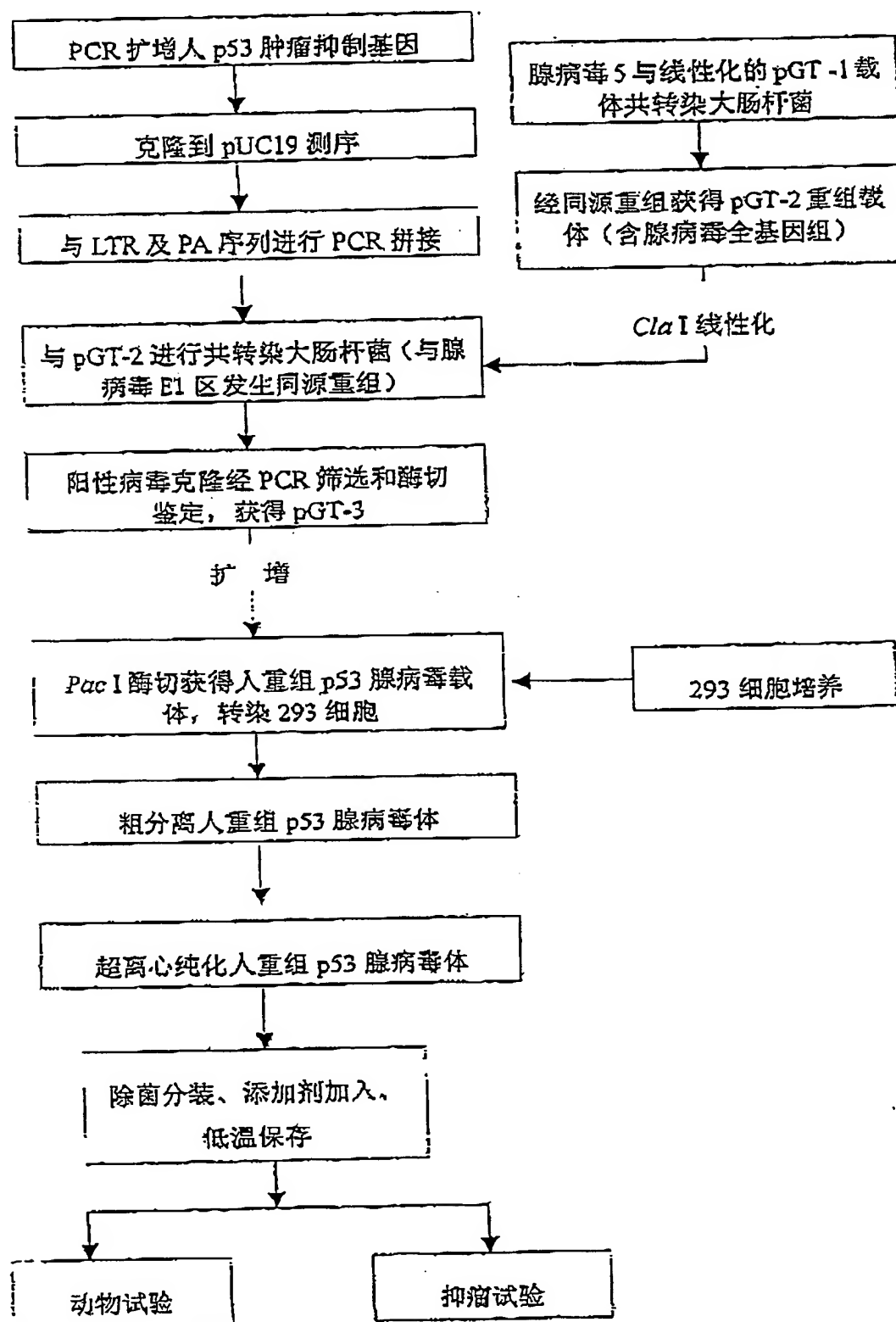


图 2

02115228.4

说明书附图 第4/14页

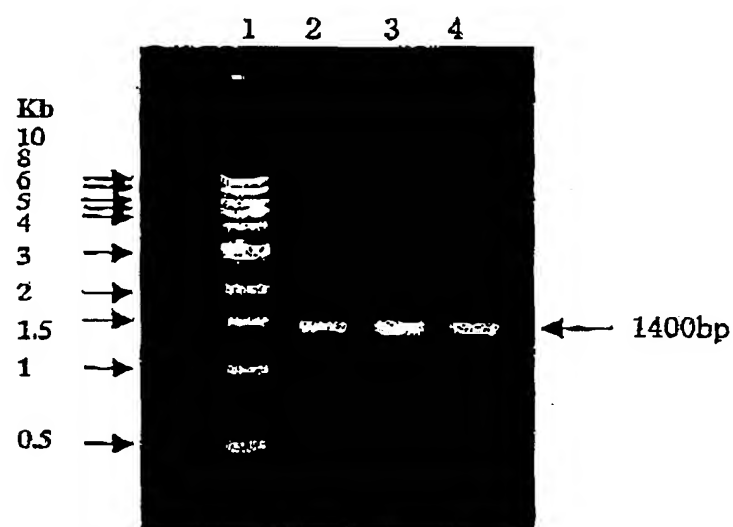


Fig. 3 PCR 扩增 p53 基因得到的 1400bp 的 p53 基因的电泳图。  
1, DNA 分子量 markers; 2、3、4, p53 cDNA 的 PCR 结果。

图 3

02115228.4

说明书附图 第5/14页

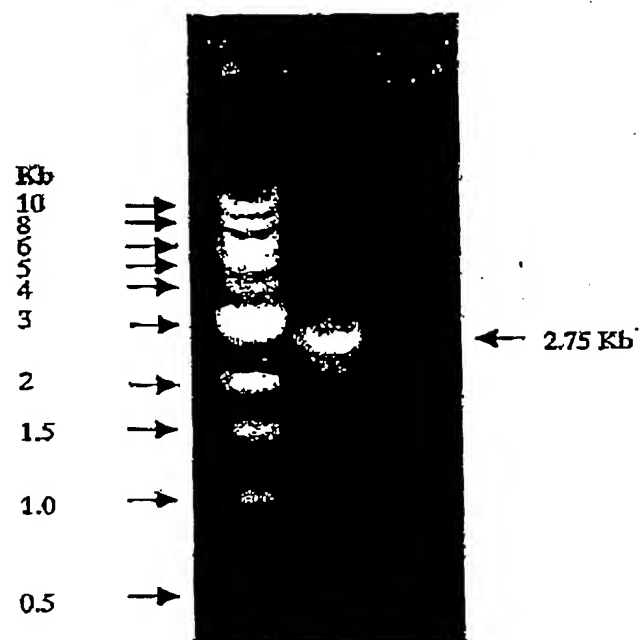


Fig. 4 PCR 扩增重组 p53 腺病毒体的表达装置, 得到的约 2750 bp 的 p53 基因的电泳图。1, DNA 分子量 markers; 2, 表达装置的 PCR 结果。

图 4

02115228.4

说明书附图 第6/14页

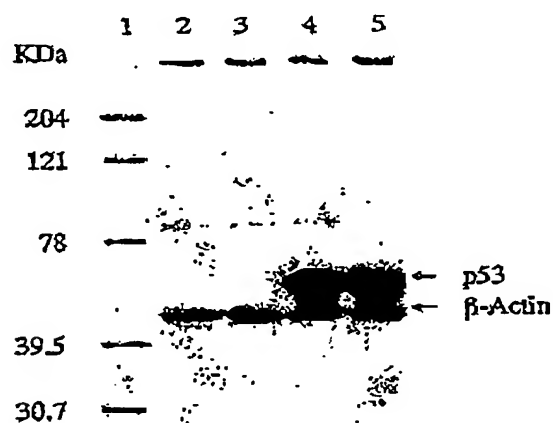


Fig5. 重组 p53 腺病毒体介导的 p53 基因在 Hep-2 和 H1299 细胞的表达。 1. 蛋白质标准分子量; 2-3. 阴性对照: 分别为未经 SBN-1 感染的 Hep-2 和 H1299 细胞; 4-5: 分别为 SBN-1 感染的 Hep-2 和 H1299 细胞。

图 5



02115228.4

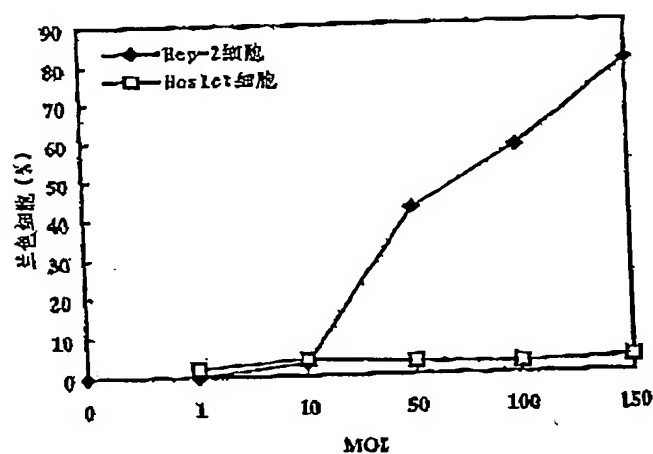


Fig6. 不同用量的重组 p53 腺病毒体对 Hep-2 细胞的杀伤效应。在 6 孔培养板中,  $1 \times 10^4$ /孔。用 MOI 0, 1, 10, 50, 100 和 150 SBN-1 感染 48hr 后, 苔酚蓝染色计数蓝色 (死亡) 细胞数。

图 6

02115228.4

说明书附图 第8/14页

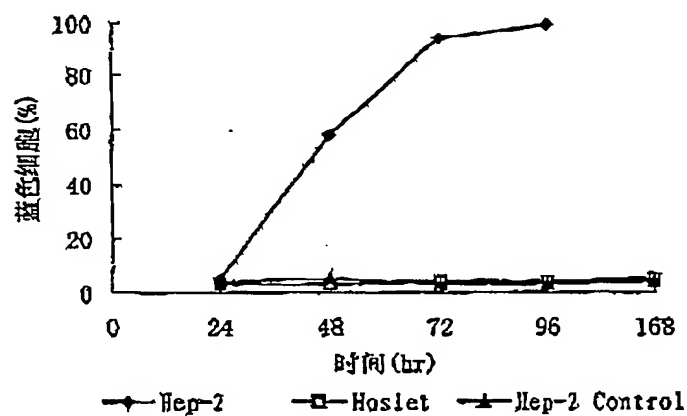


Fig7. 重组 p53 腺病毒体不同作用时间后, 对 Hep-2 细胞的杀伤效应在六孔培养板中,  $1 \times 10^4$  细胞/孔。用 100MOI 感染 Hep-2 不同时间 (24, 48, 72, 96hr) 后, 苔酚蓝染色记数蓝色 (死亡) 细胞百分数。

图 7

02115228.4

说明书附图 第9/14页

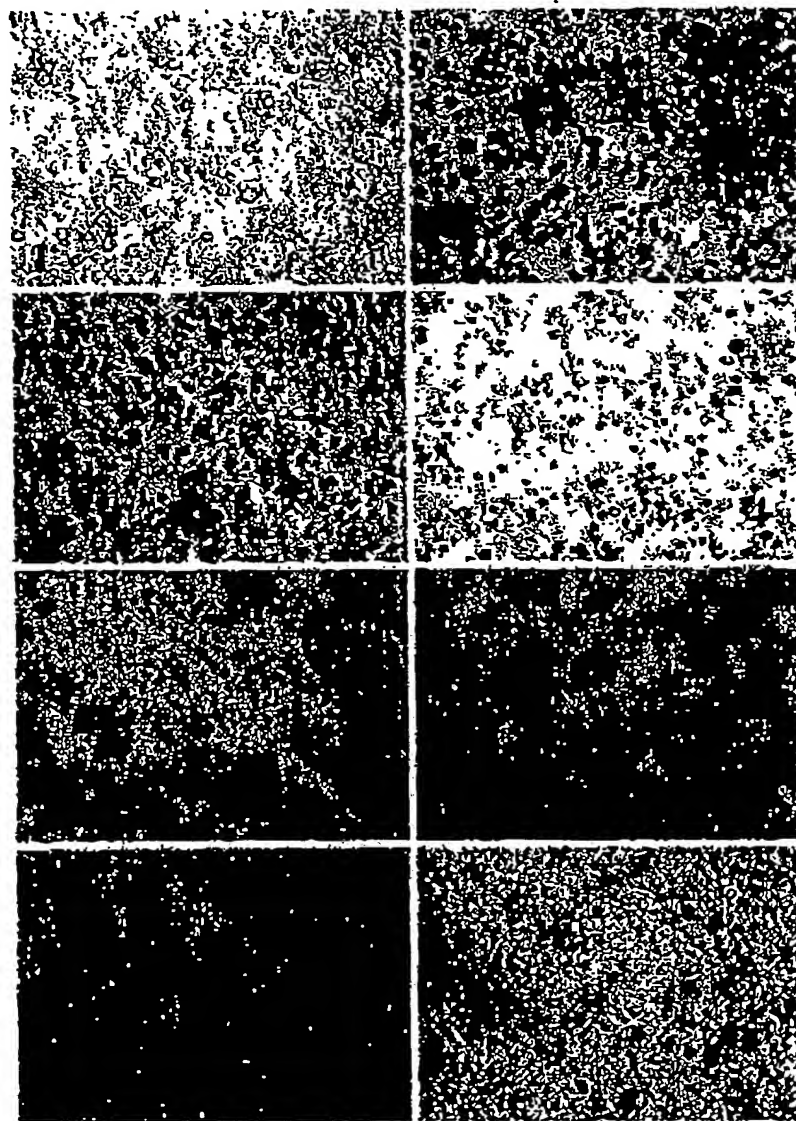


Fig 8. p53重组腺病毒体颗粒对Hep-2细胞生长的影响

(感染后36hr)

- |                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| 1. 空白对照              | 2. MOI 200           |
| 3. MOI 150           | 4. MOI 100           |
| 5. MOI 50            | 6. MOI 10            |
| 7. GFP virus MOI 200 | 8. GFP virus MOI 150 |

图 8

02115228.4

说明书附图 第10/14页

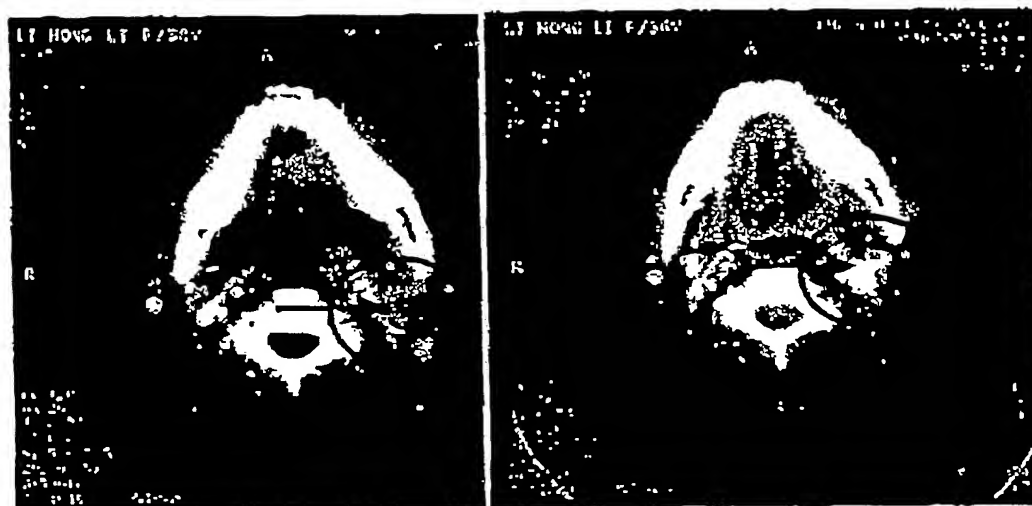


Fig.9 重组 p53腺病毒体对临床鼻咽癌病人治疗作用 (II 期临床) 的 CT 照片。  
左图为治疗前, 右图为治疗后 (肿块缩小 87%, 伴瘤内出现坏死)。

图 9

02115228.4

说明书附图 第11/14页

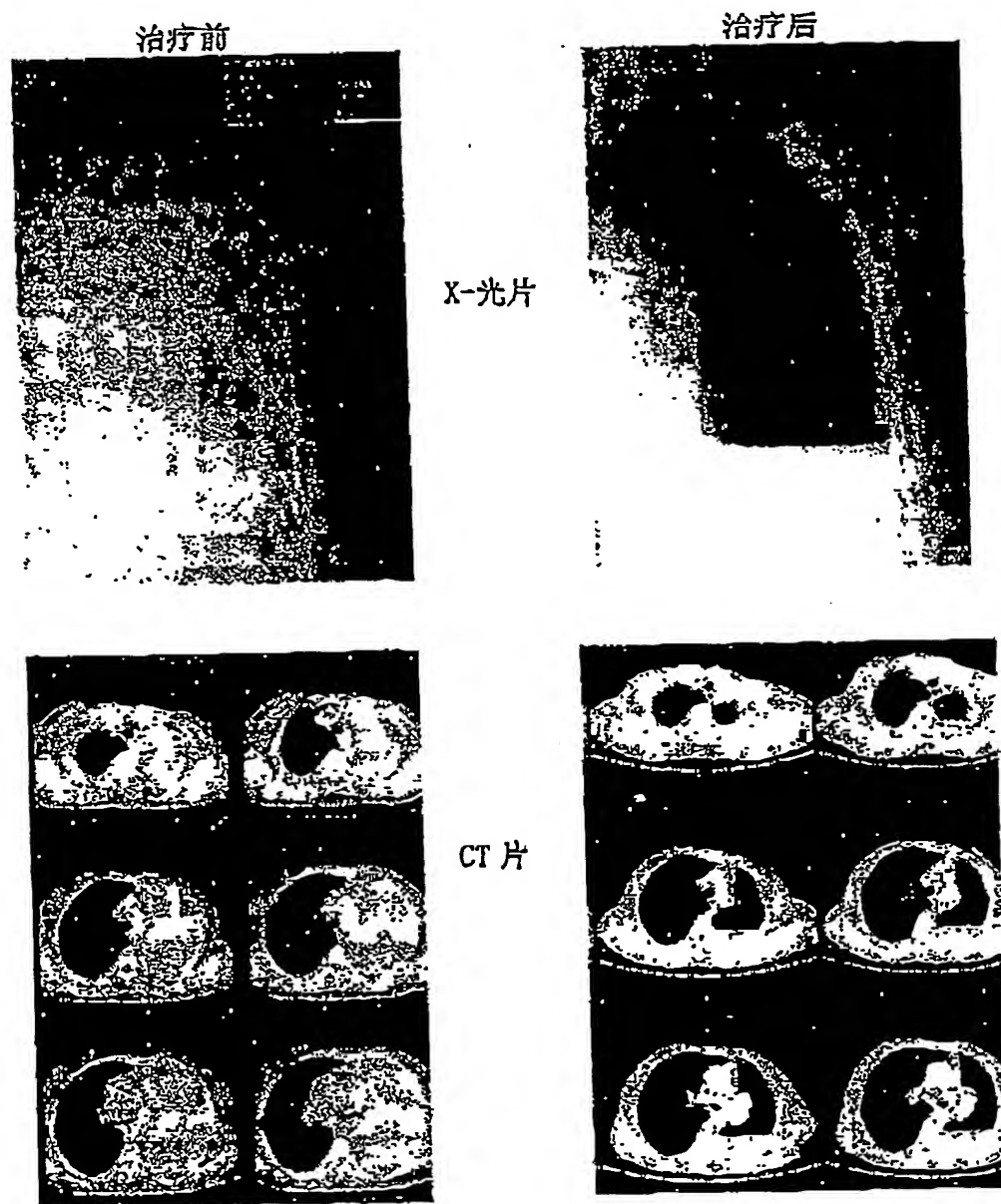


Fig. 10 重组 p53 腺病毒体对临床左肺腺癌病人的治疗作用 (II 期临床) 的 X-光照片。左图为治疗前, 右图为胸腔内注射重组 p53 腺病毒体治疗一个月后, 胸腔内积液大部分消失, 胸片清晰。

图 10

02115228.4

说明书附图 第12/14页



Fig. 11 重组 p53 腺病毒体对临床甲状腺癌病人的治疗作用 (II 期临床) 的 CT 照片。左图为治疗前, 颈前肿块  $22.5 \text{ cm}^3$ , 压迫气管; 右图为接受重组 p53 腺病毒体治疗一个月后, 肿块明显变小 ( $11.7 \text{ cm}^3$ ), 缩小 48%。

图 11

02115228.4

说明书附图 第13/14页

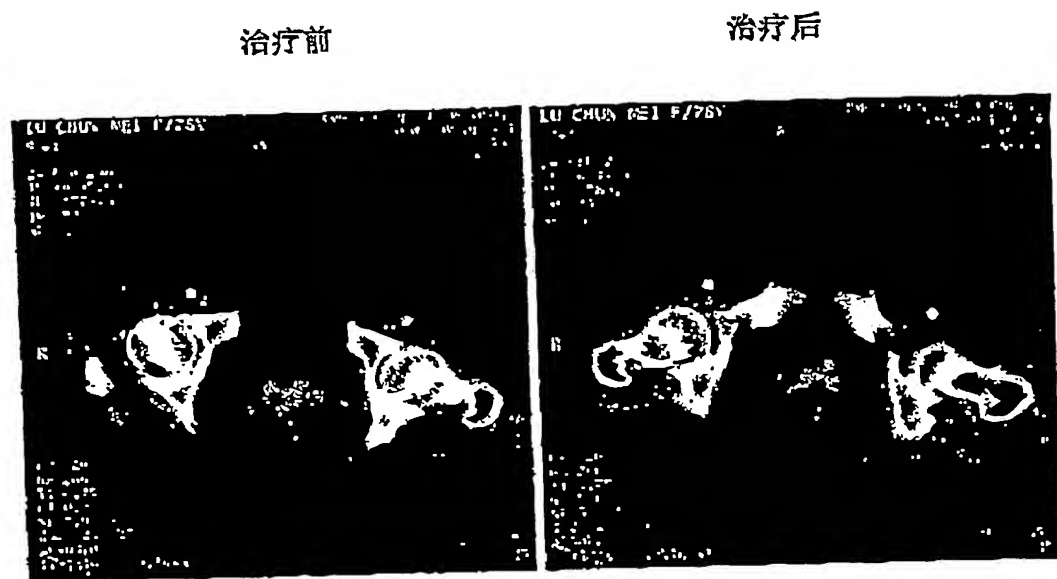


Fig. 12 重组 p53 腺病毒体对临床宫颈癌病人的治疗作用 (II 期临床) 的 CT 照片。左图为治疗前, 肿块 30 cm<sup>2</sup> ; 右图为接受重组 p53 腺病毒体治疗一个月后, 肿块明显变小 (3.8 cm<sup>2</sup>), 缩小 91%, 后消失。

图 12

02115228.4

说明书附图 第14/14页

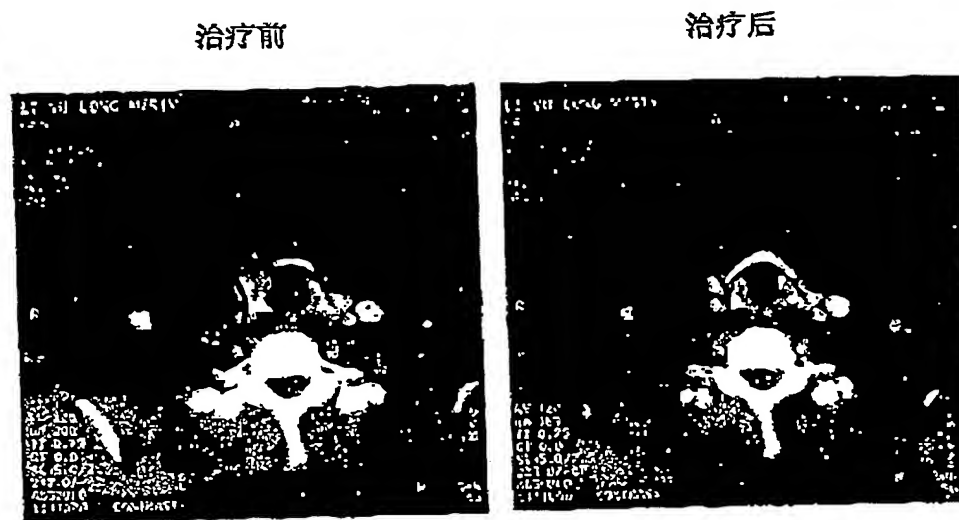


Fig. 13 重组 p53 腺病毒体对临床食道癌淋巴结转移病人的治疗作用 (II 期临床) 的 CT 照片。左图为治疗前, 肿块  $10.5 \text{ cm}^2$ ; 右图为接受重组 p53 腺病毒体治疗一个月后, 肿块明显变小 ( $7.0 \text{ cm}^2$ ), 缩小 29%。

图 13



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**